

УДК 577.214

ВЫДЕЛЕНИЕ И ХАРАКТЕРИСТИКА РЕКОМБИНАНТНОЙ РНК-ПОЛИМЕРАЗЫ *Deinococcus radiodurans**

© 2015 Д.М. Есюнина**, А.В. Кульбачинский**

Институт молекулярной генетики РАН, 123182 Москва,
пл. Курчатова, 2; факс: +7(499)196-0221,
электронная почта: es_dar@inbox.ru, akulb@img.ras.ru

Поступила в редакцию 13.04.15
После доработки 15.05.15

Радиорезистентная бактерия *Deinococcus radiodurans* является одной из самых интересных моделей для изучения стрессоустойчивости клеток. Исследования механизмов регуляции экспрессии генов у *D. radiodurans* выявили ряд особенностей транскрипционного аппарата, которые могут играть роль в устойчивости клеток к ДНК-повреждающим воздействиям. В частности, РНК-полимераза *D. radiodurans* образует нестабильные промоторные комплексы, а на стадии элонгации транскрипции способна с гораздо большей скоростью расщеплять РНК-транскрипт, чем РНК-полимераза *Escherichia coli*. Исследования структуры и функций РНК-полимеразы *D. radiodurans* затруднены в связи с отсутствием удобной генетической системы для получения мутаций в генах РНК-полимеразы и сложностью выделения фермента. В данной работе создана система для экспрессии РНК-полимеразы *D. radiodurans* в клетках *E. coli*. Получен экспрессионный вектор, содержащий гены всех субъединиц кор-фермента данной РНК-полимеразы, подобраны условия экспрессии и выделения белка, свободного от примесей. Установлено, что РНК-полимераза *D. radiodurans* обладает повышенной скоростью расщепления РНК по сравнению с ферментом *E. coli* в широком диапазоне условий, в т.ч. при различных концентрациях ионов магния и рН реакционного буфера. Разработанная экспрессионная система может быть использована для изучения особенностей реакции расщепления РНК и механизмов регуляции транскрипции у *D. radiodurans*, в т.ч. с использованием мутантных вариантов РНК-полимеразы.

КЛЮЧЕВЫЕ СЛОВА: *Deinococcus radiodurans*, экспрессия белков, РНК-полимераза, расщепление РНК.

РНК-полимераза (РНКП) – сложная молекулярная машина, которая осуществляет процесс транскрипции. У бактерий инициация транскрипции осуществляется холоферментом РНКП, содержащим σ -субъединицу, ответственную за узнавание промоторных элементов. Дальнейшие стадии транскрипции – элонгация и терминация – могут осуществляться в отсутствие σ -субъединицы кор-ферментом РНКП, состоящим из пяти субъединиц – $\alpha_2\beta\beta'\omega$. Активный центр фермента образован β - и β' -субъединицами и содержит два каталитических иона магния, которые играют ключевую роль в катализе [1–3].

На стадии элонгации транскрипции РНКП может осуществлять не только синтез, но и эн-

донуклеолитическое расщепление РНК. Предполагается, что реакция расщепления РНК играет важную роль в исправлении ошибок транскрипции и преодолении транскрипционных пауз, возникающих в ходе элонгации [4–6]. Расщеплению РНК предшествует обратное смещение элонгационного комплекса (ЭК), при этом 3'-конец РНК выходит из активного центра во вторичный канал РНКП [7, 8]. Биохимические и структурные исследования последних лет позволили предположить детальный молекулярный механизм синтеза РНК бактериальной РНКП [2, 3, 9], однако о механизме расщепления РНК известно гораздо меньше.

Deinococcus radiodurans – уникальная бактерия, обладающая высокой устойчивостью к ионизирующему излучению и целому ряду других стрессовых воздействий [10]. Было показано, что такие воздействия приводят к серьезным изменениям в экспрессии генов, что необходимо для восстановления клеток и репарации ДНК (см., например, [11, 12]). В то же время исследования особенностей транскрипционного аппарата *D. radiodurans* очень немногочисленны, что

Принятые сокращения: РНКП – РНК-полимераза, ЭК – элонгационный комплекс, ДТТ – дитиотреитол, ИПТГ – изопропил- β -D-1-тиогактопиранозид.

* Первоначально английский вариант рукописи был опубликован на сайте «Biochemistry» (Moscow), Papers in Press, BM15-118, 09.08.2015.

** Адресат для корреспонденции.

связано со сложностью выделения РНКП и транскрипционных факторов из этой бактерии и отсутствием генетической системы для получения мутаций в генах РНКП.

По сравнению с РНКП *E. coli* РНКП *D. radiodurans* образует нестабильные промоторные комплексы и с меньшей эффективностью осуществляет плавление ДНК в стартовой точке транскрипции [13]. Похожими свойствами обладает РНКП родственной термофильной бактерии *Thermus aquaticus*, причем было установлено, что они определяются как σ -субъединицей, так и кор-ферментом РНКП [13–16]. Возможная роль этих особенностей в регуляции транскрипции и стрессоустойчивости клеток неизвестна. На стадии элонгации транскрипции РНКП *D. radiodurans* проявляет гораздо большую скорость расщепления РНК, чем РНКП *E. coli*, что могло бы играть роль в транскрипции поврежденной ДНК [17–19]. Выяснение причин данных различий важно для понимания механизма реакции расщепления РНК и ее функциональной роли в транскрипции.

В настоящее время для получения бактериальной РНКП используются три основных метода: выделение нативной РНКП непосредственно из клеток; сборка *in vitro* из субъединиц, экспрессированных по-отдельности и выделенных из штаммов-продуцентов; коэкспрессия всех генов РНКП и выделение рекомбинантной РНКП.

Преимуществами последнего подхода являются большой выход белка, возможность выделения РНКП патогенных бактерий, отсутствие примесей транскрипционных факторов (в случае экспрессии в гетерологичной системе) и возможность внесения мутаций в гены РНКП. В настоящее время такие системы экспрессии получены для РНКП *E. coli* [20], *T. aquaticus* [21], *B. subtilis* [22], *M. tuberculosis* [23, 24], *X. campestris* [25] и др. Задачей данной работы было создание подобной системы экспрессии для РНКП *D. radiodurans* с целью дальнейших исследований особенностей механизмов транскрипции у этой бактерии.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

В экспериментах использовали стандартные реактивы фирм «Sigma», США (реактивы для электрофореза и буферных растворов), «New England Biolabs», США (ферменты для клонирования), «GE Healthcare», США (хроматографические колонки). Для клонирования использовали наборы фирм «Zymo Research», США и «Thermo Fisher Scientific», США. ДНК- и РНК-олигонуклеотиды были синтезированы фирмами «Синтол» и «ДНК-синтез», Россия.

Получение плазмиды pET28-rpoACBZ-Dra. Схема сборки плазмиды представлена на рис. 1, а. Гены *rpoA*, *rpoC*, *rpoB* и *rpoZ* *D. radiodurans* клони-

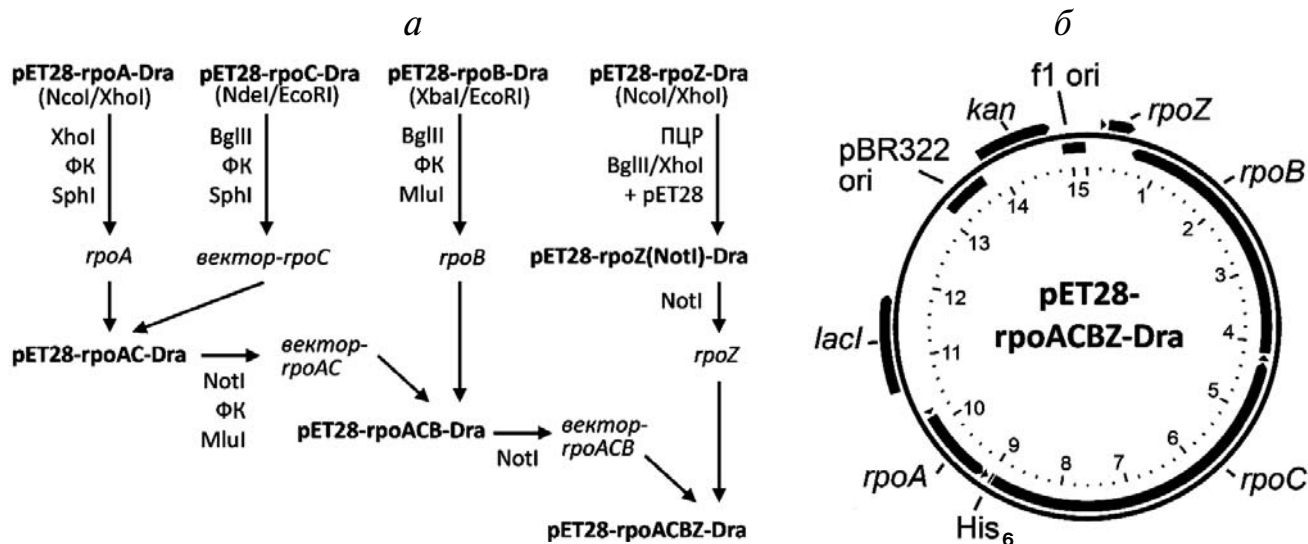


Рис. 1. Экспрессионная плаزمида pET28-rpoACBZ-Dra. а – Схема получения плазмиды (ФК – фрагмент Кленова); б – карта плазмиды. Плазмиды имеет длину 15 215 п.н., внутри показана нумерация в т.п.н. Ориджины репликации pBR322 и f1 отмечены черным цветом. Вектор pET28 кодирует устойчивость к канамицину (*kan*) и *lac*-репрессор. Гены *rpoA*, *rpoB*, *rpoC* и *rpoZ* кодируют α -, β -, β' - и ω -субъединицы кор-фермента РНКП *D. radiodurans* соответственно. Положение промоторов T7 РНКП показано черными треугольниками. В начале гена *rpoC* закодирован His₆-якорь. Карта плазмиды построена в приложении PlasMapper Version 2.0

ровали в вектор рЕТ28 по сайтам NcoI/XhoI, NdeI/EcoRI, XbaI/EcoRI и NcoI/XhoI соответственно. На основе плазмиды рЕТ28-*rpoZ*-Dra была получена плазида рЕТ28-*rpoZ*(NotI)-Dra, содержащая сайты NotI по краям гена *rpoZ*, с помощью ПЦР с праймерами *ret28*-BglII-NotI-d 5'-ATCGAGATCTGCGGCCGCGCAAATTAATACG-3' и *DraZ*-XhoI-NotI-g 5'-TCACTCGAGTGCAGTTCGCGCTCG-3' с последующим клонированием ПЦР-продукта по сайтам BglII/XhoI в вектор рЕТ28. Плазида рЕТ28-*rpoAC*-Dra была получена путем вставки гена *rpoA* из плазмиды рЕТ28-*rpoA*-Dra в плазмиду рЕТ28-*rpoC*-Dra. Для этого плазида рЕТ28-*rpoA*-Dra была обработана эндонуклеазой рестрикции XhoI, рЕТ28-*rpoC*-Dra – BglII с последующей обработкой ферментом Кленова. Обе линейные плазмиды были обработаны эндонуклеазой рестрикции SphI, и фрагмент XhoI(blunt)-SphI из рЕТ28-*rpoA*-Dra, содержащий ген *rpoA* и участок рЕТ28, был лигирован с рЕТ28-*rpoC*-Dra. Плазида рЕТ28-*rpoACB*-Dra была получена путем вставки гена *rpoB* из плазмиды рЕТ28-*rpoB*-Dra в рЕТ28-*rpoAC*-Dra. Для этого рЕТ28-*rpoB*-Dra обрабатывали BglII, рЕТ28-*rpoAC*-Dra – NotI с последующей обработкой ферментом Кленова, эндонуклеазой рестрикции MluI и лигированием. На заключительной стадии в конструкцию рЕТ28-*rpoACB*-Dra по сайту рестрикции NotI был перенесен ген *rpoZ* из плазмиды рЕТ28-*rpoZ*(NotI)-Dra. Конечная плазида рЕТ28-*rpoACBZ*-Dra кодирует все четыре субъединицы кор-фермента РНКП *D. radiodurans* с His₆-якорем на N-конце β'-субъединицы (ген *rpoC*).

Выделение белков. Кор-фермент РНКП *E. coli* экспрессировали в штамме *E. coli* BL21(DE3) с использованием плазмиды рVS10 (любезно предоставлена И. Арцимович) и выделяли, как описано ранее [20]. Рекомбинантную РНКП *D. radiodurans* экспрессировали в штамме *E. coli* BL21(DE3) с использованием плазмиды рЕТ28-*rpoACBZ*-Dra. Несколько колоний клеток-трансформантов со свежей чашки засеивали в 1 л среды LB, содержащей 50 мкг/мл канамицина и 0,1 мМ ИПТГ, и выращивали при 22° в течение 16 ч при перемешивании со скоростью 200 об/мин (конечная $OD_{600} > 3$, выход 7–9 г клеток из 1 л культуры). Клетки центрифугировали (4000 об/мин) и лизировали в буфере А (50 мМ Tris-HCl, pH 7,9, 233 мМ NaCl, 2 мМ ЭДТА, 5%-ный глицерин, 0,2%-ный Tween-20, 1 мМ β-меркаптоэтанол, 0,2 мг/мл лизоцим и 0,1 мМ фенолметилсульфонилфторид) в течение 30 мин на льду, после чего обрабатывали ультразвуком на приборе фирмы «Sonic&Materials Inc.», США (400 W). Лизат центрифугировали

(15 000 об/мин), к супернатанту добавляли Polymin P (полиэтиленмин) до конечной концентрации 0,6%. Раствор центрифугировали (13 000 об/мин), осадок промывали буфером TGED (10 мМ Tris-HCl, pH 7,9, 0,1 мМ ЭДТА, 0,1 мМ ДТТ, 5%-ный глицерин), содержащим 350 мМ NaCl, и снова центрифугировали. Белки элюировали из осадка буфером TGED, содержащим 1 М NaCl, с последующим добавлением сухого сульфата аммония (35 г на 100 мл элюата) к супернатанту при перемешивании. После высаливания осадок собирали центрифугированием (13 000 об/мин), растворяли в буфере TGED, не содержащем NaCl, и наносили на колонку с гепарин-сефарозой (5 мл Heparin-HiTrap; «GE Healthcare», США), уравновешенную буфером Б (20 мМ Tris-HCl, pH 7,9, 5%-ный глицерин, 100 мМ NaCl). Колонку последовательно промывали буфером Б, содержащим различные концентрации NaCl: при 350 мМ NaCl удаляли примесные белки, при 433 мМ NaCl элюировали РНКП *D. radiodurans*, а при 600 мМ NaCl – РНКП *E. coli*. Данная стадия позволяла удалить ~90% РНКП *E. coli*. Фракции, содержавшие РНКП *D. radiodurans*, очищали аффинной хроматографией на колонке HiTrap Chelating Column объемом 5 мл, заряженной ионами Ni²⁺. Промывку от несвязавшихся белков проводили в Ni-буфере (10 мМ Tris-HCl, pH 7,9, 500 мМ NaCl), содержащем 20 мМ имидазола. РНКП *D. radiodurans* элюировали Ni-буфером, содержащим 100 мМ имидазола. После диализа против буфера, содержащего 40 мМ Tris-HCl, pH 7,9, 100 мМ NaCl, 1 мМ ЭДТА, 0,1 мМ ДТТ, 5%-ный глицерин, РНКП очищали с использованием анионообменной хроматографии на колонке MonoQ 5/5 HR (объем 1 мл; «GE Healthcare», США). РНКП элюировали солевым градиентом с использованием буфера М (40 мМ Tris-HCl, pH 8,1, 5%-ный глицерин, 1 мМ ЭДТА, 0,1 мМ ДТТ), содержащего 0–600 мМ NaCl. Состав всех белковых фракций анализировали с помощью электрофореза по Лэммли в 8%-ном ПААГ в денатурирующих условиях. Белок концентрировали с использованием ультрафильтров Amicon 100 (до концентрации 2–10 мг/мл), добавляли глицерин до 50%, ДТТ до 1 мМ и хранили при –20 (до 1 года) или при –70 (длительное хранение). Выход РНКП составлял 2–10 мг/л культуры.

Транскрипция *in vitro*. Исследование скорости присоединения нуклеотидов и РНК-расщепляющей активности РНКП проводили с использованием транскрипционных матриц из синтетических олигонуклеотидов, как описано ранее [17, 19]. ЭК собирали из кор-фермента РНКП, матричного и нематричного ДНК-олигонуклеотидов и меченой по 5'-концу РНК в

транскрипционном буфере ТВ-40 (40 мМ Tris-HCl, рН 7,9, 40 мМ NaCl). Реакцию расщепления запускали добавлением 10 мМ MgCl₂, реакцию синтеза – добавлением 10 мМ MgCl₂ и 1 мМ NTP. В некоторых экспериментах использовали прибор для измерения быстрой ферментативной кинетики [19]. Реакцию останавливали добавлением равного объема стоп-раствора, содержащего 8 М мочевины, 2× буфер ТВЕ, 20 мМ ЭДТА. РНК-продукты разделяли в 23%-ном ПААГ, визуализировали при помощи фосфоимиджера и рассчитывали процент прореагировавшей РНК в каждой временной точке. Значения наблюдаемых констант скорости реакции (k_{obs}) вычисляли в программе GraFit (Erithacus Software) согласно уравнению кинетики реакции первого порядка:

$$A = A_{max} \times (1 - \exp(-k_{obs} \times t)),$$

где A – количество РНК-продукта, A_{max} – максимальное количество РНК-продукта, k_{obs} – константа скорости реакции первого порядка, t – время реакции. Анализ эффективности связывания ионов магния в активном центре РНКП в ходе реакции расщепления проводили путем измерения констант скорости расщепления РНК (k_{obs}) при разных концентрациях MgCl₂ (0,1–100 мМ) при 20° в буфере ТВ-40. Значение кажущейся константы диссоциации $K_{d,app}$ для связывания ионов магния вычисляли в соответствии с гиперболическим уравнением:

$$k_{obs} = k_{obs,max} \times C / (K_{d,app} + C),$$

где $k_{obs,max}$ – максимальное значение скорости расщепления при насыщающей концентрации ионов магния, C – концентрация ионов Mg²⁺ в реакции. Измерения скоростей расщепления РНК при различных рН реакционного буфера проводили в буфере, содержащем Tris-HCl (для значений рН 7,3, 7,7, 8,0, 8,3, 8,7, 9,0, 9,3) или CAPS (3-(циклогексиламино)-1-пропансульфоновая кислота)-NaOH (рН 10), в присутствии 10 мМ MgCl₂ при 20° для РНКП *E. coli* и при 10° для РНКП *D. radiodurans*.

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Получение рекомбинантной РНКП *D. radiodurans*. Плазмида рЕТ28-ргоАСВZ-Dra (рис. 1, б), кодирующая α -, β -, β' - и ω -субъединицы корфермента РНКП *D. radiodurans*, была получена путем постадийного клонирования генов отдельных субъединиц в вектор рЕТ28. В полученной конструкции все гены РНКП *D. radiodurans*

(*rpoA*, *rpoB*, *rpoC*, *rpoZ*) находятся под контролем промоторов РНКП фага Т7, а β' -субъединица содержит на *N*-конце His₆-якорь.

Для экспрессии РНКП *D. radiodurans* был использован штамм *E. coli* BL21(DE3), содержащий хромосомную копию гена Т7 РНКП под контролем индуцибельного *lac*-промотора. Подбор условий экспрессии показал, что оптимальными условиями для получения активной РНКП является рост клеток в присутствии 0,1 мМ ИПТГ при комнатной температуре (22°). В этих условиях видно появление в клетках белков, соответствующих по подвижности α -, β - и β' -субъединицам РНКП *D. radiodurans* (рис. 2, 1). При повышении температуры происходит сверхэкспрессия β' -субъединицы и появление тел включения, а при понижении температуры – уменьшение количества индуцируемого белка.

Выделение РНКП было проведено стандартными методами (рис. 2): лизис клеток (1), осаждение нуклеиновых кислот и связанных с ними белков (в т.ч. РНКП) полиэтиленимином (2), хроматография на гепарин-сефарозе (3, 4), Ni-аф-

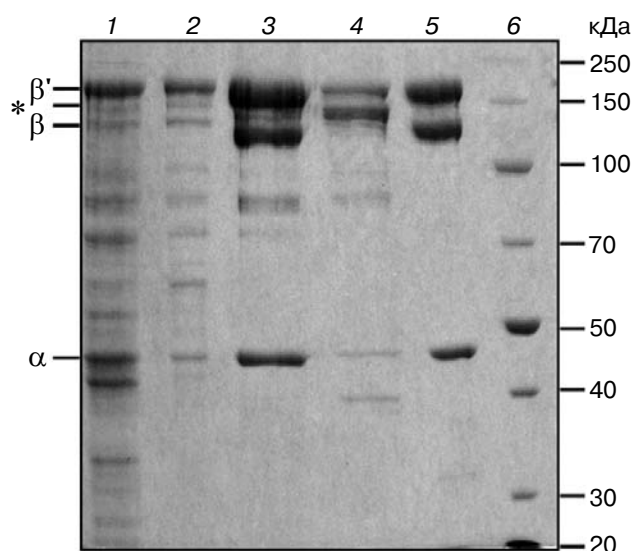


Рис. 2. Электрофореграмма белковых фракций, полученных на разных стадиях выделения РНКП *D. radiodurans*: 1 – лизат клеток *E. coli* после экспрессии РНКП *D. radiodurans*; 2 – элюат после преципитации полиэтиленимином до нанесения на гепариновую колонку; 3 – хроматография на гепарин-сефарозе, фракция элюции РНКП *D. radiodurans* при промывке буфером с 433 мМ NaCl; 4 – фракция элюции РНКП *E. coli* при промывке буфером с 600 мМ NaCl; 5 – Ni-аффинная хроматография, фракция элюции; 6 – белковый маркер (Thermo Scientific PageRuler Unstained Broad Range Protein Ladder, «Thermo Scientific», США). Слева отмечено положение субъединиц РНКП *D. radiodurans*, звездочкой показаны β - и β' -субъединицы РНКП *E. coli*, имеющие приблизительно равную массу

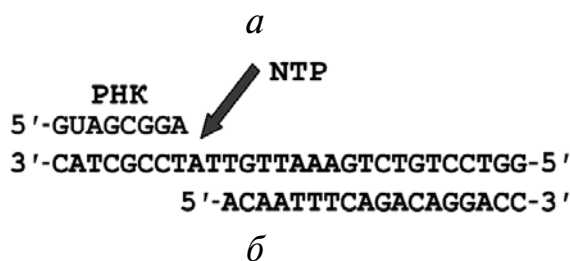
финная хроматография (5) и анионообменная хроматография на колонке MonoQ. Важной задачей работы было добиться очистки РНКП *D. radiodurans* от примеси РНКП *E. coli*. Такая очистка происходит при проведении хроматографии на гепарин-сефарозе, т.к. две РНКП элюируются с колонки при разной концентрации соли (433 и 600 мМ NaCl для РНКП *D. radiodurans* и *E. coli* соответственно; рис. 2, 3 и 4). Оставшаяся примесь РНКП *E. coli* удаляется при проведении Ni-аффинной хроматографии, т.к. только РНКП *D. radiodurans* содержит в своем составе His₆-якорь. После стадии Ni-аффинной хроматографии при окраске по Кумасси чистота препарата РНКП *D. radiodurans* составляет >98%. Заключительная стадия ионообменной хроматографии (колонка MonoQ) была проведена для удаления возможных примесей транскрипционных факторов *E. coli*, которые могли бы связываться с РНКП *D. radiodurans* и изменять ее свойства. Сравнение препаратов РНКП до и после стадии анионообменной хроматографии не выявило различий в их чистоте и каталитической активности.

Анализ транскрипционных свойств РНКП *D. radiodurans*. Активность выделенной РНКП анализировали с помощью транскрипции *in vitro* в тестах по синтезу и расщеплению РНК. Измерение скорости включения нуклеотидов проводили в искусственных ЭК, полученных с использованием синтетических олигонуклеотидов, соответствующих гибриду РНК–ДНК и переднему дуплексу ДНК в ЭК (рис. 3, а). Использование таких комплексов позволяет измерить непосредственно скорость присоединения нуклеотида к РНК, исключив стадию инициации транскрипции.

Было показано, что рекомбинантная РНКП *D. radiodurans* не отличается по скорости включения УТР (комплементарен следующему нуклеотиду матрицы после 3'-конца РНК) от нативной РНКП, выделенной из клеток *D. radiodurans* ($k_{\text{obs}} \approx 210$ и 215 с^{-1} соответственно при 30°) (рис. 3, б, [19]). РНКП *D. radiodurans* также лишь незначительно превосходит РНКП *E. coli* по скорости синтеза РНК (не более чем в 2 раза, рис. 3, б). Кроме того, были измерены скорости присоединения некомплементарного нуклеотида (СТР) и точность синтеза РНК, которая может быть представлена как соотношение скоростей включения правильного и неправильного нуклеотидов. Оказалось, что скорость присоединения СТР РНКП *D. radiodurans* примерно в 1,5 раза выше, чем РНКП *E. coli*. Таким образом, данные РНКП не обладают значительными различиями в скорости и точности синтеза РНК (рис. 3, б).

Для измерения скорости расщепления РНК была использована синтетическая матрица, состоящая из трех олигонуклеотидов: матричной цепи ДНК, нематричной цепи ДНК и РНК-транскрипта длиной 15 нуклеотидов (рис. 4, а). Как было показано ранее, ЭК, полученные с использованием синтетических олигонуклеотидов подобной структуры, не отличаются по своим свойствам от природных комплексов [26, 27]. Сборку комплексов проводили в транскрипционном буфере, не содержащем ионов двухвалентных металлов. Реакцию запускали добавлением ионов Mg^{2+} ; при этом происходило отщепление двух нуклеотидов с 3'-конца РНК с образованием 13-нуклеотидного РНК-продукта (показано стрелкой на рис. 4, а). Было установлено, что в данном ЭК рекомбинантная РНКП *D. radiodurans* расщепляет РНК в 27 раз быстрее, чем РНКП *E. coli* ($k_{\text{obs}} = 0,83 \pm 0,15$ и $0,03 \pm 0,007 \text{ мин}^{-1}$ соответственно при 20°, 10 мМ MgCl_2 , pH 7,9). Это согласуется с ранее опубликованными данными о повышенной скорости расщепления РНК нативной РНКП, выделенной из клеток *D. radiodurans* [17].

Известно, что скорость расщепления РНК значительно зависит от концентрации ионов Mg^{2+} , которые играют ключевую роль в катализе, участвуя в координации субстратов в активном центре РНКП [28, 29]. Для выявления воз-



РНКП	УТР $k_{\text{obs}} (\text{с}^{-1})$	СТР $k_{\text{obs}} (\text{с}^{-1})$	УТР/СТР
Eco	112 ± 18	$0,015 \pm 0,002$	7500
Dra	209 ± 77	$0,022 \pm 0,002$	9500

Рис. 3. Измерение скорости включения нуклеотидов РНКП *D. radiodurans* (Dra) и *E. coli* (Eco). а – Схема реакции присоединения нуклеотидов в искусственном ЭК. Стрелкой показано место включения нуклеотида в РНК; б – константы скоростей включения нуклеотидов. Реакцию проводили при 30° в присутствии 1 мМ УТР (комплементарный нуклеотид) или 1 мМ СТР (некомплементарный нуклеотид). Соотношения скоростей включения «правильного» и «неправильного» нуклеотидов приведены в последнем столбце таблицы

можных различий в связывании каталитических ионов РНКП *E. coli* и *D. radiodurans* расщепление РНК было проанализировано при различных концентрациях $MgCl_2$ (0,1–100 мМ). Было установлено, что РНКП *D. radiodurans* значительно превосходит РНКП *E. coli* по скорости расщепления РНК при всех использованных концентрациях $MgCl_2$ (рис. 4, б). На основании концентрационной зависимости скоростей реакции были вычислены значения константы диссоциации ($K_{d,app}$) для ионов Mg^{2+} . Оказалось, что по эффективности связывания ионов Mg^{2+} РНКП *D. radiodurans* лишь незначительно отличается от РНКП *E. coli* (примерно в 2 раза, $K_{d,app} = 23 \pm 5$ мМ и 55 ± 2 мМ соответственно). Кроме того, значительные различия в скоростях расщепления между данными РНКП сохраняются и при насыщающих концентрациях Mg^{2+} (k_{obs} при 100 мМ $MgCl_2$ различаются в 16 раз, сос-

тавляя $0,167 \pm 0,004$ и $2,8 \pm 0,1$ мин⁻¹ для РНКП *E. coli* и *D. radiodurans* соответственно).

Еще одним фактором, определяющим разницу между РНКП *E. coli* и *D. radiodurans* в скоростях расщепления РНК, могли бы быть различия в рН-зависимости данной реакции, т.к. известно, что расщепление РНК бактериальной РНКП значительно активируется при повышенных значениях рН [9, 30–32]. Однако проведенные эксперименты показали схожую рН-зависимость скоростей расщепления РНК для обеих исследуемых РНКП в области значений рН 7–10 (рис. 4, в). При повышении рН > 8,0–8,5 наблюдался рост скоростей расщепления РНК как для РНКП *E. coli*, так и для РНКП *D. radiodurans*. Стоит отметить, что в данном случае эксперимент с РНКП *D. radiodurans* проводили при меньшей температуре, чем с РНКП *E. coli* (10 и 20° соответственно), что было необходимо для

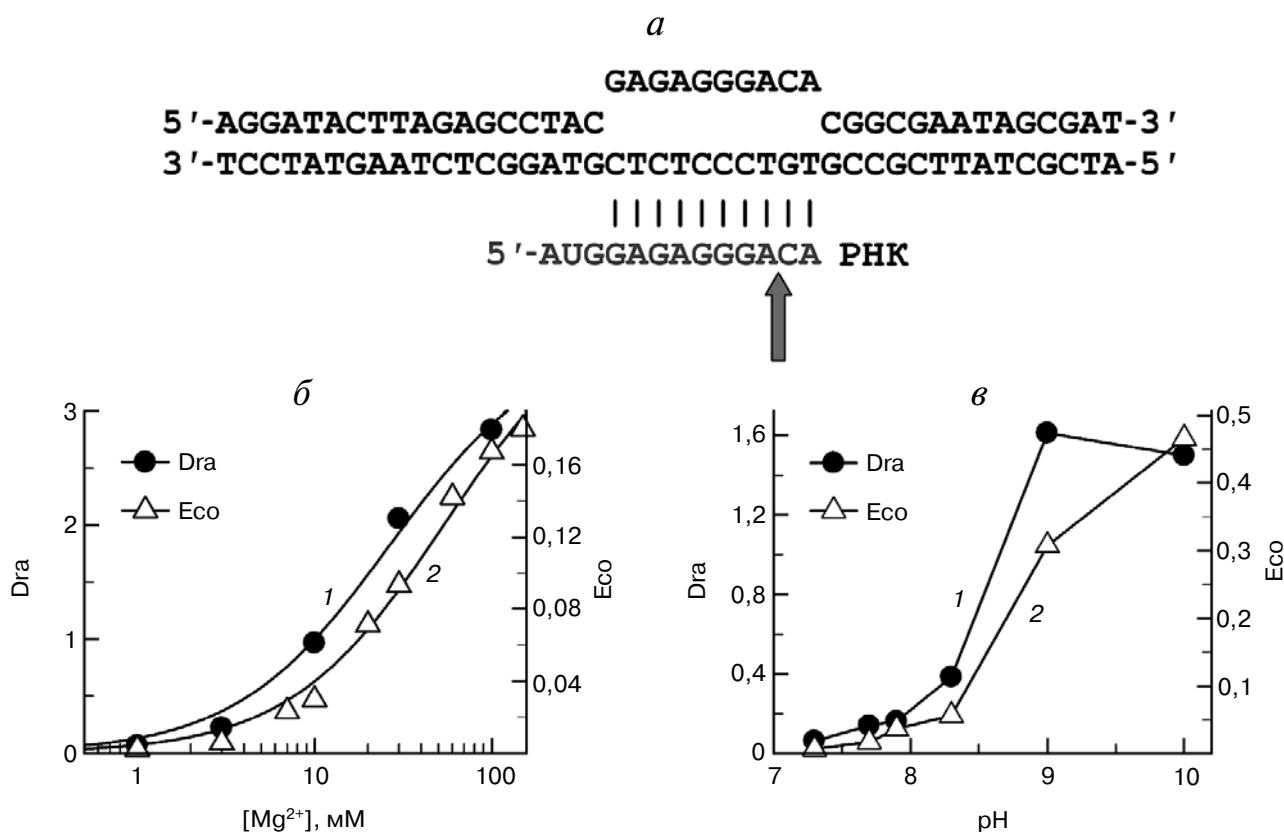


Рис. 4. Анализ реакции расщепления РНК ферментами *D. radiodurans* (Dra) и *E. coli* (Eco). а – Схема использованного искусственного ЭК. Место расщепления РНК показано стрелкой; б – зависимость скорости реакции расщепления РНК РНКП *D. radiodurans* и *E. coli* от концентрации $MgCl_2$. По оси абсцисс отложены значения концентрации $MgCl_2$, по осям ординат – константы скорости расщепления РНК (k_{obs} , мин⁻¹) для РНКП *D. radiodurans* (1) и *E. coli* (2) при 20°. Приведены результаты одного из измерений; в – рН-зависимость скорости реакции расщепления РНК РНКП *E. coli* и *D. radiodurans*. По оси абсцисс отложены значения рН, по осям ординат – константы скорости расщепления РНК (k_{obs} , мин⁻¹) для РНКП *D. radiodurans* (при 10°; 1) и *E. coli* (при 20°; 2)

измерения очень высоких скоростей реакции при повышенных значениях pH. Тем не менее даже в этих условиях скорость расщепления РНК в случае РНКП *D. radiodurans* значительно (в 4–5 раз) превышает скорость работы РНКП *E. coli* во всем диапазоне pH.

Таким образом, различия РНКП *E. coli* и *D. radiodurans* в реакции расщепления РНК лишь незначительно связаны с различиями в связывании каталитических ионов Mg^{2+} и в pH-зависимости реакции.

ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

Создание системы экспрессии рекомбинантной РНКП *D. radiodurans* – важный шаг для изучения аппарата транскрипции этой бактерии, т.к. позволяет получать высокоочищенные препараты РНКП и ее мутантных вариантов для исследований *in vitro*. В нашей работе получен вектор для экспрессии кор-фермента РНКП *D. radiodurans* в клетках *E. coli*. Созданная плазмида аналогична описанной ранее для РНКП близкородственной *D. radiodurans* бактерии *T. aquaticus* [21]. Подбор условий экспрессии показал, что при «мягких» условиях индукции (при низкой концентрации ИПТГ и комнатной температуре) удается получить достаточно большой выход белка (до 10 мг очищенного белка из 1 л культуры клеток). Выделение рекомбинантной РНКП *D. radiodurans* стандартными методами (преципитация с полиэтиленимином, хроматография на гепарин-сефарозе и Ni-аффинная хроматография) позволяет избавиться от примесей РНКП *E. coli* и других клеточных белков. Дополнительная анионообменная хроматография не приводит к изменениям транскрипционной активности выделяемой РНКП, но уменьшает суммарный выход белка. В целом метод позволяет выделять РНКП, лишенную примесей транскрипционных факторов *D. radiodurans* и *E. coli*.

Анализ свойств рекомбинантной РНКП в экспериментах по транскрипции *in vitro* не выявил существенных отличий от нативной РНКП, выделенной непосредственно из клеток *D. radiodurans* [13, 17–19]. Измерение скоростей включения «правильного» и «неправильного» нуклеотидов в искусственных ЭК показало, что РНКП *D. radiodurans* примерно в 1,5–2 раза быстрее катализирует реакцию, чем РНКП *E. coli*, и не отличается от последней по точности синтеза РНК. Это согласуется с ранее опубликованными данными о том, что эти РНКП незначительно различаются по средней скорости элонгации транскрипции [13, 17].

В то же время РНКП *D. radiodurans* обладает повышенной скоростью расщепления РНК на

стадии элонгации транскрипции (данная работа, [17]). Реакция расщепления РНК происходит в смещенных ЭК, которые могут образовываться при включении в РНК ошибочных нуклеотидов и наличии различных препятствий на матрице ДНК [6, 33]. В подобных случаях расщепление РНК будет способствовать исправлению ошибок транскрипции и реактивации арестованных ЭК. В связи с этим можно предполагать, что повышенная скорость расщепления РНК в случае РНКП *D. radiodurans* может иметь значение в стрессовых условиях, в т.ч. при наличии большого числа повреждений в ДНК. Стоит отметить, что реакция расщепления РНК бактериальной РНКП также стимулируется специальными Gre-факторами [28, 29], причем экспрессия фактора GreA в клетках *D. radiodurans* возрастает после облучения [11].

В реакции расщепления РНК связывание ионов Mg^{2+} в активном центре РНКП происходит гораздо менее эффективно, чем при включении нуклеотидов, что может иметь регуляторное значение [26, 28, 29]. Возможной причиной повышенной скорости реакции в случае РНКП *D. radiodurans* могло бы быть более эффективное связывание ионов магния. Однако проведенные нами эксперименты показали, что РНКП *E. coli* и *D. radiodurans* имеют сходную зависимость скоростей реакции от концентрации ионов магния, причем РНКП *D. radiodurans* проявляет гораздо большую скорость расщепления даже при насыщающих концентрациях ионов.

Связывание ионов магния в активном центре происходит с участием остатков аспарагиновой кислоты мотива NADFDGD β' -субъединицы РНКП (остатки 458–464 по нумерации *E. coli*); данная последовательность идентична у всех РНКП. В то же время было показано, что замена соседнего неконсервативного остатка в РНКП *E. coli* на соответствующий остаток РНКП *D. radiodurans* (A455E) приводит к увеличению скорости расщепления РНК примерно в 2 раза [17]. Можно предположить, что это объясняется как раз влиянием данной замены на связывание ионов магния (в соответствии с наблюдаемыми небольшими различиями в связывании данных ионов РНКП *D. radiodurans* и *E. coli*, см. рис. 4, б), но данная гипотеза нуждается в дальнейшей экспериментальной проверке.

Скорость расщепления РНК значительно зависит от pH реакционного буфера, что, вероятно, связано с ионизацией определенных групп в активном центре фермента [9, 30–32]. В случае РНКП *E. coli* и *T. aquaticus* данная реакция активируется при pH > 8,5. Мы показали, что в случае РНКП *D. radiodurans* сохраняется похожая зависимость, причем при всех изученных значе-

ниях рН скорость расщепления значительно превышает скорость для РНКП *E. coli*. Таким образом, наблюдаемые различия, вероятно, не связаны с различиями в ионизации функциональных групп активного центра, вовлеченных в реакцию расщепления. Предположительно, причиной данных различий могут являться особенности структуры активного центра и контактов РНКП *D. radiodurans* с нуклеиновыми кислотами в ходе реакции расщепления. Анализ этих особенностей является важной задачей дальнейшей работы.

Разработанная нами система экспрессии рекомбинантной РНКП *D. radiodurans* делает возможным исследование детальных механизмов катализа различных реакций в активном центре данной РНКП, в т.ч. с применением мутантных вариантов фермента. Кроме того, данная система может быть использована для изучения механизмов регуляции экспрессии генов с участием транскрипционных факторов *D. radiodurans*.

Работа выполнена при финансовой поддержке РФФИ (грант 14-14-01074).

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- Haugen, S.P., Ross, W., and Gourse, R.L. (2008) Advances in bacterial promoter recognition and its control by factors that do not bind DNA, *Nature Rev. Microbiol.*, **6**, 507–519.
- Nudler, E. (2009) RNA polymerase active center: the molecular engine of transcription, *Annu. Rev. Biochem.*, **78**, 335–361.
- Пупов Д.В., Кульбачинский А.В. (2010) Структурная динамика активного центра многосубъединичных РНК-полимераз в процессе синтеза и редактирования РНК, *Мол. биол.*, **44**, 573–590.
- Sydow, J.F., and Cramer, P. (2009) RNA polymerase fidelity and transcriptional proofreading, *Curr. Opin. Struct. Biol.*, **19**, 732–739.
- Gordon, A.J., Halliday, J.A., Blankschien, M.D., Burns, P.A., Yatagai, F., and Herman, C. (2009) Transcriptional infidelity promotes heritable phenotypic change in a bistable gene network, *PLoS Biol.*, **7**, e44.
- Nudler, E. (2012) RNA polymerase backtracking in gene regulation and genome instability, *Cell*, **149**, 1438–1445.
- Cheung, A.C., and Cramer, P. (2011) Structural basis of RNA polymerase II backtracking, arrest and reactivation, *Nature*, **471**, 249–253.
- Sekine, S., Murayama, Y., Svetlov, V., Nudler, E., and Yokoyama, S. (2015) The ratcheted and ratchetable structural states of RNA polymerase underlie multiple transcriptional functions, *Mol. Cell*, **57**, 408–421.
- Sosunova, E., Sosunov, V., Epshtein, V., Nikiforov, V., and Mustaev, A. (2013) Control of transcriptional fidelity by active center tuning as derived from RNA polymerase endonuclease reaction, *J. Biol. Chem.*, **288**, 6688–6703.
- Slade, D., and Radman, M. (2011) Oxidative stress resistance in *Deinococcus radiodurans*, *Microbiol. Mol. Biol. Rev.*, **75**, 133–191.
- Liu, Y., Zhou, J., Omelchenko, M.V., Beliaev, A.S., Venkateswaran, A., Stair, J., Wu, L., Thompson, D.K., Xu, D., Rogozin, I.B., Gaidamakova, E.K., Zhai, M., Makarova, K.S., Koonin, E.V., and Daly, M.J. (2003) Transcriptome dynamics of *Deinococcus radiodurans* recovering from ionizing radiation, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **100**, 4191–4196.
- Luan, H., Meng, N., Fu, J., Chen, X., Xu, X., Feng, Q., Jiang, H., Dai, J., Yuan, X., Lu, Y., Roberts, A.A., Luo, X., Chen, M., Xu, S., Li, J., Hamilton, C.J., Fang, C., and Wang, J. (2014) Genome-wide transcriptome and antioxidant analyses on gamma-irradiated phases of *deinococcus radiodurans* R1, *PLoS One*, **9**, e85649.
- Kulbachinskiy, A., Bass, I., Bogdanova, E., Goldfarb, A., and Nikiforov, V. (2004) Cold sensitivity of thermophilic and mesophilic RNA polymerases, *J. Bacteriol.*, **186**, 7818–7820.
- Barinova, N., Zhilina, E., Bass, I., Nikiforov, V., and Kulbachinskiy, A. (2008) Lineage-specific amino acid substitutions in region 2 of the RNA polymerase sigma subunit affect the temperature of promoter opening, *J. Bacteriol.*, **190**, 3088–3092.
- Miropolskaya, N., Ignatov, A., Bass, I., Zhilina, E., Pupov, D., and Kulbachinskiy, A. (2012) Distinct functions of regions 1.1 and 1.2 of RNA polymerase sigma subunits from *Escherichia coli* and *Thermus aquaticus* in transcription initiation, *J. Biol. Chem.*, **287**, 23779–23789.
- Mekler, V., Minakhin, L., Kuznedelov, K., Mukhamedyarov, D., and Severinov, K. (2012) RNA polymerase-promoter interactions determining different stability of the *Escherichia coli* and *Thermus aquaticus* transcription initiation complexes, *Nucleic Acids Res.*, **40**, 11352–11362.
- Пупов Д.В., Баринова Н.А., Кульбачинский А.В. (2008) Анализ РНК-расщепляющей активности РНК-полимераз *E. coli* и *D. radiodurans*, *Биохимия*, **73**, 903–908.
- Miropolskaya, N., Artsimovitch, I., Klimasauskas, S., Nikiforov, V., and Kulbachinskiy, A. (2009) Allosteric control of catalysis by the F loop of RNA polymerase, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **106**, 18942–18947.
- Miropolskaya, N., Esyunina, D., Klimasauskas, S., Nikiforov, V., Artsimovitch, I., and Kulbachinskiy, A. (2014) Interplay between the trigger loop and the F loop during RNA polymerase catalysis, *Nucleic Acids Res.*, **42**, 544–552.
- Svetlov, V., and Artsimovitch, I. (2015) Purification of bacterial RNA polymerase: tools and protocols, *Methods Mol. Biol.*, **1276**, 13–29.
- Kuznedelov, K., Minakhin, L., and Severinov, K. (2003) Preparation and characterization of recombinant *Thermus aquaticus* RNA polymerase, *Methods Enzymol.*, **370**, 94–108.
- Yang, X., and Lewis, P.J. (2008) Overproduction and purification of recombinant *Bacillus subtilis* RNA polymerase, *Protein Expr. Purif.*, **59**, 86–93.
- Banerjee, R., Rudra, P., Prajapati, R.K., Sengupta, S., and Mukhopadhyay, J. (2014) Optimization of recombinant *Mycobacterium tuberculosis* RNA polymerase expression and purification, *Tuberculosis*, **94**, 397–404.
- Hu, Y., Morichaud, Z., Perumal, A.S., Roquet-Baneres, F., and Brodolin, K. (2014) *Mycobacterium* RbpA cooperates with the stress-response sigmaB subunit of RNA polymerase in promoter DNA unwinding, *Nucleic Acids Res.*, **42**, 10399–10408.

25. Cheng, C.Y., Yu, Y.J., and Yang, M.T. (2010) Coexpression of omega subunit in *E. coli* is required for the maintenance of enzymatic activity of *Xanthomonas campestris* pv. *campestris* RNA polymerase, *Protein Expr. Purif.*, **69**, 91–98.
26. Sosunov, V., Zorov, S., Sosunova, E., Nikolaev, A., Zakeyeva, I., Bass, I., Goldfarb, A., Nikiforov, V., Severinov, K., and Mustaev, A. (2005) The involvement of the aspartate triad of the active center in all catalytic activities of multisubunit RNA polymerase, *Nucleic Acids Res.*, **33**, 4202–4211.
27. Zenkin, N., Yuzenkova, Y., and Severinov, K. (2006) Transcript-assisted transcriptional proofreading, *Science*, **313**, 518–520.
28. Laptenko, O., Lee, J., Lomakin, I., and Borukhov, S. (2003) Transcript cleavage factors GreA and GreB act as transient catalytic components of RNA polymerase, *EMBO J.*, **22**, 6322–6334.
29. Sosunova, E., Sosunov, V., Kozlov, M., Nikiforov, V., Goldfarb, A., and Mustaev, A. (2003) Donation of catalytic residues to RNA polymerase active center by transcription factor Gre, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **100**, 15469–15474.
30. Orlova, M., Newlands, J., Das, A., Goldfarb, A., and Borukhov, S. (1995) Intrinsic transcript cleavage activity of RNA polymerase, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **92**, 4596–4600.
31. Sosunov, V., Sosunova, E., Mustaev, A., Bass, I., Nikiforov, V., and Goldfarb, A. (2003) Unified two-metal mechanism of RNA synthesis and degradation by RNA polymerase, *EMBO J.*, **22**, 2234–2244.
32. Yuzenkova, Y., and Zenkin, N. (2010) Central role of the RNA polymerase trigger loop in intrinsic RNA hydrolysis, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **107**, 10878–10883.
33. McGlynn, P., Savery, N.J., and Dillingham, M.S. (2012) The conflict between DNA replication and transcription, *Mol. Microbiol.*, **85**, 12–20.

PURIFICATION AND CHARACTERIZATION OF RECOMBINANT *Deinococcus radiodurans* RNA POLYMERASE

D. M. Esyunina*, A. V. Kulbachinskiy*

*Institute of Molecular Genetics, Russian Academy of Sciences,
pl. Kurchatova 2, Moscow 123182, Russia; fax: +7(499)196-0221,
E-mail: es_dar@inbox.ru, akulb@img.ras.ru*

Received April 13, 2015

Revision received May 15, 2015

The radioresistant bacterium *Deinococcus radiodurans* is one of the most interesting models for studies of cell stress resistance. Analysis of the mechanisms of gene expression in *D. radiodurans* revealed some specific features of the transcription apparatus that might play a role in cell resistance to DNA-damaging conditions. In particular, RNA polymerase from *D. radiodurans* forms unstable promoter complexes, and during transcription elongation, it has a much higher rate of RNA cleavage than RNA polymerase from *Escherichia coli*. Analysis of the structure and functions of *D. radiodurans* RNA polymerase is difficult due to the absence of convenient genetic systems for making mutations in the RNA polymerase genes and difficulties with enzyme purification. In this work, we developed a system for expression of *D. radiodurans* RNA polymerase in *E. coli* cells. We obtained an expression vector encoding all core RNA polymerase subunits and defined optimal conditions for the expression and purification of the RNA polymerase. We found that *D. radiodurans* RNA polymerase has much higher rates of RNA cleavage than *E. coli* RNA polymerase under a wide range of conditions, including variations in the concentration of catalytic magnesium ions and pH of the reaction buffer. The expression system can be used for further studies of the RNA cleavage reaction and mechanisms of transcription regulation in *D. radiodurans*, including analysis of mutant RNA polymerase variants.

Key words: *Deinococcus radiodurans*, protein expression, RNA polymerase, RNA cleavage